

**VERGLEICH ZWEIER METHODEN ZUR BEURTEILUNG
DER GRANULOZYTENMORPHOLOGIE BEI
ENTZÜNDLICHEN ERKRANKUNGEN**

WALTER KOCH

1986

Aus der Kinderpoliklinik der Universität München

Professor Dr. med. Heinz Spiess

Vergleich zweier Methoden zur Beurteilung der

Granulozytenmorphologie bei entzündlichen

Erkrankungen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Walter Koch

aus

Aachen

1986

Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. J. Suschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Spiess

Mitberichterstatter: Frau Dr. Messerer

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 10. 6. 1986

DANK

Herrn Professor Dr. med. H. J. Suschke
danke ich besonders für die Überlassung des Themas,
für seine unkonventionelle, freundliche, wertvolle
Beratung und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. H. Spiess
danke ich für die Genehmigung, die Arbeit an der
Kinderpoliklinik durchführen zu dürfen.

Frau Dr. Messerer
vom Institut für Statistik und Biomathematik
der Universität München
danke ich für ihre Unterstützung bei der Statistik.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	S. 1
1.1	Granulozytenmorphologie	S. 2
2.	Aufgabenstellung	S. 4
2.2	Patientengut	S. 5
3.	Beschreibung der Methoden	S. 6
4.	Ergebnisse	S. 12
4.2	Entzündungskriterien	S. 14
4.3	Korrelationen	S. 17
4.4	Vergleich	S. 23
5.	Diskussion	S. 24
6.	Zusammenfassung	S. 31
7.	Literatur	S. 32

1. Einleitung

Die in der Klinik standardisiert durchgeführte Färbung der Blutaussstriche nach Pappenheim führt bei entzündlichen Erkrankungen häufig nur zu den enttäuschenden Aussagen der Linksverschiebung und toxischen Granulation. Granulozytose, Granulozytopenie und das Verhältnis von unreifen Granulozyten zur Gesamtzahl der neutrophilen Granulozyten (I/T Quotient) geben weitere Hinweise auf den Verlauf der Entzündung. So ist es z. B. für den Neonatologen sehr wichtig, schon früh den Beginn einer Sepsis zu diagnostizieren, wobei die herkömmlichen Laborparameter oft unzureichend sind, bzw. zu spät kommen (z. B. Blutkultur). Auch bei chronischen Entzündungen (Kollagenosen) ist der Aussagewert der Pappenheimfärbung über den Verlauf der Therapie oft nicht ausreichend. Phagozytose von Antigenen und infektiösem Material bewirkt Freisetzung von aggressiven Sauerstoffprodukten und Enzymen. Neben der Vernichtung von Antigenen kommt es unter Umständen zur Schädigung körpereigenen Gewebes, was überwiegend bei septischen Erkrankungen eine Rolle spielt.

In der Kinderpoliklinik werden zwei fluoreszenzmikroskopische Methoden von Suschke et alii angewendet. Die erste, im folgenden Benzolfärbung genannt, ermöglicht eine Unterscheidung degranulierter von granulierten Granulozyten. Die zweite, die im folgenden als Heparinfärbung bezeichnet wird, differenziert devitalisierte von vitalen Phagozyten. Wie frühere Arbeiten zeigten (2 24), ergänzen beide Methoden die Ergebnisse der nach wie vor unentbehrlichen Pappenheimfärbung. Mit der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob Zusammenhänge zwischen beiden Methoden bestehen.

1.1 Granulozytenmorphologie

Die wichtigste Aufgabe der Granulozyten im Verlauf einer bakteriellen Infektion ist die Chemotaxis und Phagozytose. Hierzu kommt es - je nach Aufbereitung des Bakteriums - auf unterschiedliche Art und Weise:

Bei der membrangebundenen Bakterizidie kommt es nach Anheftung eines opsonierten Bakteriums an der Granulozytenmembran zur Abgabe bakterizider Stoffe wie z.B. Myeloperoxidase. Bei der Ingestion wird das von Antikörpern ummantelte Bakterium in die Phagozyten aufgenommen, dabei wird durch Einstülpung der Zellmembran eine Vakuole gebildet. Nach Verschmelzung mit der Vakuolenmembran geben spezifische und unspezifische Granula ihren Inhalt in diese Vakuolen ab, so entsteht ein Phagolysosom. In den spezifischen Granula sind als neutrale Proteinase eine Kollagenase, eine kollagenolytisch Metallproteinase sowie Lysozym, Lactoferrin und Vitamin B₁₂-bindendes Protein. Aus azidophilen Granula werden saure Hydrolasen, als neutrale Proteinase Elastase und Kathepsin G sowie Myeloperoxidase und Lysozym isoliert. Normalerweise zeigt sich morphologisch eine Phagozytose als Degranulierung im gefärbten Blutaussstrich. (4 5 21 22)

Bei vielen akuten und chronischen Entzündungen kommt es nach Besetzung des aus Antigen und Antikörper gebildeten Immunkomplexes zur Exostose lysosomaler Enzyme, die in den Granula der Granulozyten lokalisiert sind. Die sich daraus ergebende partielle oder totale Degranulierung der Granulozyten ist aber mit der Pappenheimfärbung nicht sichtbar zu machen. Das liegt zum Teil daran, daß der Lipidanteil der Zellmembranen oft Einblicke in das Zellinnere verwehrt. Durch Herauslösen des Lipidanteiles der Zellmembran durch Chloroform, Benzol u.a. Lösungsmitteln wurde in Kombination mit einer Fluoreszenzfärbung versucht, diese Einblicke zu erhalten.

Bei der zweiten Fluoreszenzfärbung wird eine Unterscheidung zwischen vitalen von zugrunde gegangenen

Leukozyten vorgenommen. Grundlage dieser Methode sind verschiedene Ladungen an den Membranen lebender Zellen. Venös entnommenem Blut wird das Polyanion Heparin angeboten, das sich bei enthaltenem Membranpotential der Zellen elektrostatisch an die positiven Ladungen bindet und durch ein Fluorochrom sichtbar gemacht wird. Bei devitalisierten Zellen ist das Potential zusammengebrochen und es kann sich kein Heparin angelagern.

Bei der allgemein üblichen Beurteilung des Blutbildes wird neben der Bestimmung der Blutkörperchen-Senkungsgeschwindigkeit, der Bestimmung des qualitativen CRP die Zahl der Leukozyten in der Pappenheimfärbung sowie der Anteil der stabkernigen Granulozyten in Prozent angegeben.

2. Aufgabenstellung

Die spezifische Granulierung der polymorphkernigen Granulozyten kann durch eine unten näher beschriebene Fluoreszenzfärbung sichtbar gemacht werden.

Gleichzeitig ist es möglich, durch eine noch zu erläuternde Fluoreszenzfärbung nach Einwirkung von Heparin devitalisierte und noch vitale Phagozyten zu differenzieren.

Während bei gesunden Menschen fast 100 % der Granulozyten granuliert sind, findet man bei Patienten mit entzündlichen Erkrankungen eine erhöhte Zahl degranulierter Granulozyten. (24)

Wie zur Zeit noch in Vorbereitung befindliche Arbeiten zeigen, kommt es auch bei der Heparinfärbung zu einem Anstieg der devitalisierten Phagozyten bei entzündlichen Erkrankungen. In der Zeit vom März 1985 bis zum Juni 1985 wurden bei 50 unausgewählten Kindern Blutabnahmen durchgeführt. Gleichzeitig mit der routinemäßigen Laborbestimmung des Blutbildes (BKS, CRP, sowie Leukozyten und stabkernige in % nach Pappenheim) wurde die Heparin- bzw. Benzolfärbung angefertigt.

Diese Arbeit hat die Prüfung der Frage zum Ziel, ob beide Färbungen das gleiche Phänomen anzeigen; gibt es bei einer hohen Zahl von degranulierten Granulozyten auch einen Anstieg der devitalisierten Granulozyten?

2.1 Patientengut

Es handelte sich um 50 unausgewählte Kinder mit folgenden Krankheiten:

- 13 Pat. mit Seronegativer ICA
- 8 gesunde Pat.
- 6 Pat. mit Oligoarthritis Typ 1
- 6 Pat. mit einem Infekt
- 2 Pat. mit Sklerodermie
- 2 Pat. mit einer reaktiven Arthritis
- 2 Pat. mit einer chronisch juvenilen Arthritis
- 1 Pat. mit Sarkoidose
- 1 Pat. mit Morbus Behcet
- 1 Pat. mit einem Anfallsleiden
- 1 Pat. in einem Zustand nach Subsepsis Allergica Wissler
- 1 Pat. mit Morbus Pringle
- 1 Pat. mit Colitis ulcerosa
- 1 Pat. mit Osteomyelitis
- 1 Pat. mit Morbus Scheuermann
- 1 Pat. mit Purpura Waldenström
- 1 Pat. einer systemischen ICA
- 1 Pat. mit einer Carnitinmyopathie.

3. Beschreibung der Methoden

3.1 Benzolfärbung: 0,2 ml Blut werden mit 0,005 ml Benzol versetzt und 1 Minute geschüttelt. Anschließend Zugabe von 0,2 ml einer wässrigen 5×10^{-5} -Pseudoisocyanidlösung und 20 Minuten färben. Anfertigen der Blutausstriche und Auswertung im Fluoreszenzmikroskop Ortholux 2 (Leitz) mit dem Blauregerfilter BG 12 und dem Sperrfilter TG 510.

Es werden etwa 1-2 ml Blut venös abgenommen und sofort mit EDTA beschickt.

Das Blut muß innerhalb einer Stunde verarbeitet werden. Pseudoisocyaninchlorid (PIC) ist ein kationischer Farbstoff, der sich an anionischen Gruppen anlagert. Damit der Farbstoff zu Polymeren aggregiert und dadurch seine Fluoreszenzeigenschaften erhält, müssen die Abstände der negativen Ladungen in einem bestimmten Bereich liegen. Zu den Polyanionen in den Zellen gehören DNA, RNA, Glykosaminoglykane, Phospholipide und bestimmte Eiweißkörper. (17)

Die mit PIC gefärbten Granulozyten würden ohne Benzoleinwirkung als fadenförmige, grüngelbe Strukturen erscheinen, es sind dann keine Granula erkennbar. Dafür wären die Lymphozyten und Monozyten durch Einlagerung von Fluoreszenzfarbstoff erkennbar.

Durch Benzol verschwindet jedoch die PIC-Anlagerung an den Lymphozyten und es kommt zur selektiven Darstellung der Granula in den Granulozyten.

Beschreibung der Zellen:

Der Zellkern und das Zellplasma zeigen eine grüngelbe Untergrundeffloreszenz. Eine Differenzierung der Zellen ist durch eine Einteilung in Zellgröße, Kernform, Kern-

größe und Kernstruktur möglich. Die leuchtend gelben Granula der Granulozyten sind am einfachsten zu erkennen.

Die Granulozyten erkennt man am stab- oder polymorphen Kern, an dem kleinen Kern/Plasma-Verhältnis und vor allem an den leuchtenden Granula. Zu den degranulierten zählen die, die 0 bis 5 Granula und die typische Kernform haben.

Wurde nur ein Zellkern gefunden ohne Plasma, Zellwand oder Granula, wurde er zu den degranulierten gezählt.

Strukturen, die sowohl ein Granulozytenkern als auch ein Lymphozytenkern oder ein Monozytenkern sein könnten, wurden als nicht zu differenzierend bezeichnet.

Eosinophile Granulozyten, erkennbar an den leuchtend grünen Granula, wurden zu den granulierten Granulozyten gezählt.

Lymphozyten und Monozyten sind durch einen großen, runden Kern mit angedeuteter Radspeicherstruktur erkennbar.

Während die Granulozyten, die ohne Lipidlösungsmittel-Inkubation mit dieser Färbung ungranuliert erscheinen, eine intensive grünlich-orangefarbene Granulierung ausweisen, sind in Monozyten nur spärlich Granula zu finden. Bei entzündlichen Erkrankungen, bei denen zirkulierende Immunkomplexe am Unterhalt der Entzündung beteiligt sind, kommt es nun zu einer partiellen oder totalen Degranulierung einzelner Granulozyten, wobei die Anzahl degranulierter Granulozyten zur Aktualität des Krankheitsgeschehens in Beziehung steht.



DEGRANULIERTER GRANULOZYT

GRANULIERTER GRANULOZYT

Leider sieht man auf dem Schwarzweißbild nicht die typische Färbung, die Granulierung des rechten Granulozyten ist jedoch deutlich zu erkennen.

3.2. Heparinfärbung: Venöses Blut wird in EDTA-Gefäße überführt und innerhalb einer Stunde wie folgt verarbeitet: 0,05 ml EDTA-Blut werden 0,05 ml Barbital Na/HCl-Puffer (0,1n, ph 7) zugesetzt. Anschließend Zugabe von 0,002 ml Heparin-Natrium (Braun) = 10 IE und Schütteln der Probe. Anfertigen von Blutaussstrichen.

Nach sorgfältigem Trocknen der Ausstriche Färbung mit einer 0,4%-igen 9-Aminoacrididinhydrochlorid-Lösung (Merck) für 20 Minuten. Der Farbstoff wird in 50%-igem Äthanol gelöst. Gründliches Abspülen der Objektträger mit 70%igem Äthanol und erneutes Trocknen. Zweitfärbung mit einer wässrigen Acridinorangelösung (Merck) 1:30.000 für 2 Minuten. Entfernen des Farbstoffes und Trocknen der Ausstriche. Die Auswertung erfolgt im Fluoreszenzmikroskop Ortholux (Leitz) mit dem Ölimmersionsobjekt 100/1,30. Untersuchung der Präparate in Auflicht-Fluoreszenz mit einer Xenon-Hochdrucklampe 75 in Verbindung mit dem Blauregerfilter BG 12 (Leitz) und dem Sperrfilter TK 510 (Leitz). Photographische Aufnahmen mit Ectachrome Highspeed (Tageslicht). Belichtungszeit 5-10 Sekunden.

3.3 Beschreibung der Zellen: Die im peripheren Blut vorkommenden Zellen, also Erythrozyten, Lymphozyten, Monozyten sowie Granulozyten, weisen die von der Pappenheimfärbung her bekannten Formen auf. Alle vitalen Zellen sind von orange-fluoreszierenden, kugelförmigen Partikeln umgeben, die aus einem Heparin-Farbstoffkomplex bestehen. Dieser Komplex wird unmittelbar an den Membranen der Zellen gefunden, soweit diese intakt sind. Der Zellkern von mononukleären Zellen und Granulozyten fluoresziert grün bis gelb, das Zellplasma erscheint in einem hellen Grün. Vitale Thrombozyten und Erythrozyten weisen ebenfalls eine Grünfluoreszenz des Plasmas auf. Devitalisierte Zellen lagern Heparin nicht an ihre Zellmembran an und können so leicht von vitalen Zellen unterschieden werden. Kern und Zellplasma verlieren

überdies ihre gelbe bzw. grüne Fluoreszenz, es tritt eine Braunfärbung auf und die Zellen zerfließen oft. Die Bilder 2 und 3 zeigen vitale und devitalisierte Zellen.

Auch hier geht leider im Schwarzweißbild die typische Färbung verloren, die vitalen Phagozyten sind jedoch deutlich durch eine Heparin-Anlagerung zu erkennen.

Devitalisierte Zellen sind hauptsächlich Granulozyten und Monozyten. Aus der Form der Zellen ist die Zugehörigkeit zu den einzelnen Zelltypen (Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) nicht immer zu beweisen, da diese Zellen einerseits keinen Heparin-Farbstoffkomplex mehr anlagern und außerdem einen Fluoreszenzverlust aufweisen.

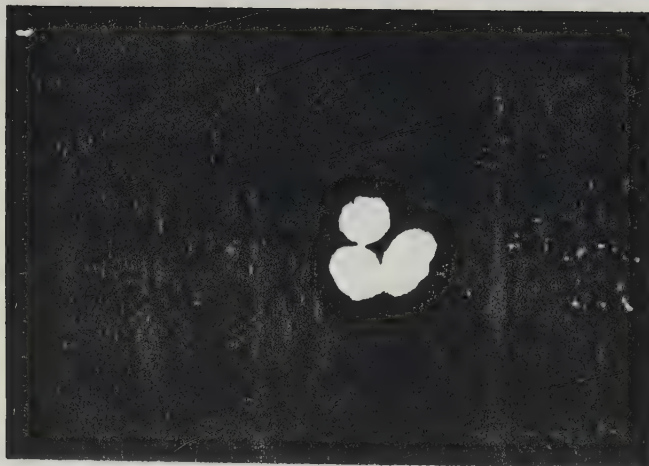


Bild 2

devitaler Granulozyt

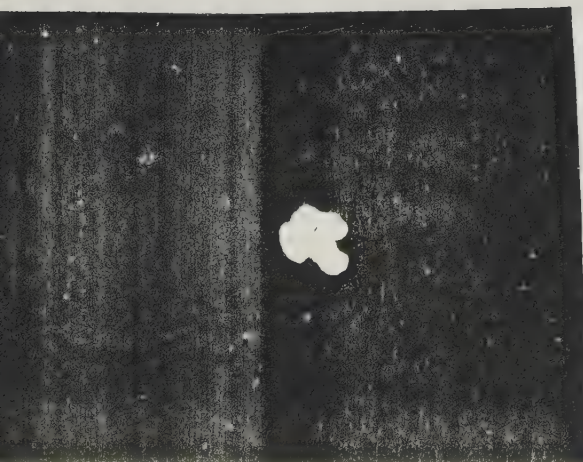


Bild 3

vitaler Granulozyt

4. Ergebnisse

4.1 Tabelle 1

gr: Granulierte Granulozyten
 ngr: nicht granulierte Granulozyten
 ly: Lymphozyten
 mo: Monozyten
 nd: nicht zu differenzierende Zellen
 igr: intakte Granulozyten
 dgr: defekte Granulozyten
 st: stabkernige Granulozyten
 bks: Blutkörperchen-Senkungsgeschwindigkeit
 crp: C-reaktives Protein

Benzol				Heparin				Pappenheim									
gr	ngr	ly	mo	nd	igr	dgr	ly	mo	gr	st	ly	mo	bks	crp	leuk	n	
71	3	16		4	6	77	00	18	5	75	5	18	8	9	-	7700	1
60	7	13		1	19	66	1	29	4	66	6	30	4	34	-	9200	2
79	9	1		1	10	70	15	10	5	82	13	16	2	35	+	7800	3
49	15	24		4	8	41	7	44	8	53	4	46	1	17	-	6700	4
55	16	18		4	7	57	3	35	5	63	4	30	7	35	+	5500	5
62	6	11		2	19	54	14	26	6	61	6	25	8	31	+	4100	6
57	8	23		3	9	66	2	30	4	67	3	26	7	37	+	8600	7
54	5	33		2	6	39	4	53	4	54	8	43	3	23	-	8600	8
64	3	25		3	5	61	1	30	8	63	2	26	11	9	-	9700	9
61	10	16	00	13	45	10	38	7	58	5	34	8	9	-	5000	10	
35	15	38		2	10	34	4	58	4	40	00	58	2	13	-	5300	11
55	2	23		1	19	54	4	36	6	56	6	35	9	4	-	5600	12
48	2	46		1	3	42	2	50	6	44	2	53	3	2	-	6600	13
46	11	17		6	20	45	24	25	6	53	15	42	5	5	-	10700	14
42	9	42		1	6	40	3	50	7	39	4	59	2	12	-	7300	15
50	9	28		4	9	41	19	33	7	43	2	51	6	5	-	3700	16

gr ngr ly mo nd igr dgr ly mo gr st ly mo bks crp leuk n

67	4	16	2	11	68	4	21	7	75	15	16	9	2	-	7400	17
55	20	6	1	18	60	14	22	4	64	21	28	8	32	+	10700	18
16	3	49	2	30	11	18	65	6	28	2	69	3	4	-	11600	19
60	8	20	1	11	65	5	26	4	87	6	10	3	5	-	14900	20
53	3	33	3	8	39	8	46	7	55	4	40	5	20	+	5300	21
55	5	29	4	7	52	6	34	8	51	00	40	9	15	-	6000	22
35	5	47	10	3	40	2	49	9	43	5	51	6	8	-	4000	23
53	9	25	5	8	48	3	43	6	45	00	52	3	8	-	4900	24
45	25	15	5	10	40	10	48	2	61	2	36	3	34	-	6300	25
55	20	14	5	6	65	6	22	7	75	2	22	3	14	-	5500	26
50	13	25	7	5	47	3	45	5	54	1	43	3	14	-	6100	27
72	12	20	1	7	60	5	31	4	69	3	36	3	18	-	6800	28
53	13	23	3	8	24	13	60	3	20	00	75	5	17	-	9700	29
60	23	15	00	2	58	2	36	4	61	8	37	2	56	+	9200	30
72	1	24	2	1	70	6	18	6	69	7	28	3	32	-	9700	31
67	8	19	5	1	50	4	42	4	49	1	49	2	4	-	6500	32
51	14	26	3	6	36	14	46	4	36	00	60	4	8	-	12200	33
53	7	37	2	1	47	14	34	5	49	00	49	2	10	-	9200	34
47	12	31	5	5	44	3	44	9	52	1	44	4	41	+	5000	35
47	12	25	16	00	54	2	38	6	51	6	45	4	6	-	5000	36
60	13	19	00	8	51	10	34	5	66	00	32	2	17	+	3700	37
67	9	18	2	4	60	4	30	6	74	12	25	1	4	-	6300	38
73	8	12	4	3	56	4	36	4	61	10	37	2	22	-	5600	39
60	10	25	3	2	68	2	26	4	52	26	43	5	43	-	6800	40
67	9	16	2	6	64	5	25	6	62	9	32	6	44	+	15700	41
67	11	15	4	3	62	2	31	5	46	16	52	2	23	-	5300	42
41	9	37	4	9	35	16	46	3	38	5	58	4	37	-	6300	43
61	6	25	6	2	58	5	31	6	59	00	31	10	21	-	7100	44
44	9	31	1	15	46	5	43	6	48	00	42	10	3	-	6000	45
67	9	12	4	8	69	5	17	9	75	3	19	7	20	-	4600	46
52	4	35	4	5	47	10	34	9	65	00	29	6	41	+	5900	47
51	13	27	3	6	55	7	32	6	70	5	28	2	33	+	7800	48
42	4	48	2	4	44	4	48	4	42	2	52	6	16	-	5900	49
61	6	25	6	2	58	5	31	6	59	1	31	10	46	+	7900	50

4.2 Entzündungskriterien

Bei der Benzolfärbung gilt ein Ansteigen der Zahl der ngr als Entzündungszeichen.

Bei der Heparinfärbung ist die Zahl der dgr als Hinweis auf eine Entzündung wichtig.

Um beide besser miteinander vergleichen zu können, bilden wir bei der Benzolfärbung die Quotienten:

$$\frac{\text{ngr}}{\text{ngr} + \text{gr}} \quad \text{B1} \quad \text{bzw.} \quad \frac{\text{ngr}}{\text{ngr} + \text{gr} + \text{mo}} \quad \text{B2}$$

Bei der Heparinfärbung ergibt sich dementsprechend:

$$\frac{\text{dgr}}{\text{dgr} + \text{igr}} \quad \text{H1} \quad \text{bzw.} \quad \frac{\text{dgr}}{\text{dgr} + \text{igr} + \text{mo}} \quad \text{H2}$$

Bei der in der Klinik allgemein gebräuchlichen Beurteilung des Blutbildes nach Pappenheim sowie der Bestimmung der bks und des crp ergeben sich folgende Entzündungskriterien:

st > 5% bks > 20 mm crp: + leuko > 10000 / mm³

Bei Vorhandensein aller vier Kriterien ist in der Tabelle ein ++++ angegeben.

4.2.1. Tabelle 2

B1	H1	Pappenheim	Nummer	B2	H2
0,0405	0,0000	0000	1	0,0385	000000
0,1045	0,0149	++	2	0,1029	0,0141
0,1023	0,1765	+++	3	0,1011	0,1667
0,2344	0,1458	0000	4	0,2206	0,1250
0,2254	0,0500	++	5	0,2133	0,0455
0,0882	0,2059	+++	6	0,0857	0,1892
0,1231	0,0303	++	7	0,1176	0,0286
0,0847	0,0930	++	8	0,0820	0,0851
0,0448	0,0161	0000	9	0,0429	0,0143
0,1408	0,1818	0000	10	0,1408	0,1613
0,3000	0,1053	0000	11	0,2885	0,0952
0,0351	0,0690	+	12	0,0345	0,0625
0,0400	0,0454	0000	13	0,0392	0,0400
0,1930	0,3478	++	14	0,1746	0,3200
0,1765	0,0698	0000	15	0,1698	0,0600
0,1525	0,3167	0000	16	0,1429	0,2836
0,0563	0,0556	+	17	0,0548	0,0506
0,2667	0,1892	++++	18	0,2632	0,1795
0,1579	0,6207	+	19	0,1429	0,5143
0,1176	0,0714	++	20	0,1159	0,0676
0,0536	0,1702	+	21	0,0508	0,1481
0,0833	0,1034	0000	22	0,0781	0,0909
0,1250	0,0476	0000	23	0,1000	0,0392
0,1452	0,0588	0000	24	0,1343	0,0526
0,3571	0,2000	+	25	0,3333	0,1923
0,2703	0,0845	0000	26	0,2500	0,0769
0,2063	0,0600	0000	27	0,1857	0,0545
0,1667	0,0769	0000	28	0,1644	0,0725
0,2321	0,3514	0000	29	0,1884	0,3250
0,2771	0,0333	+++	30	0,2771	0,0313
0,0137	0,0789	++	31	0,0133	0,0732
0,1067	0,0740	0000	32	0,1000	0,0690
0,2154	0,2800	+	33	0,2059	0,2593

B1	H1	Pappenheim	Nummer	B2	H2
0, 1167	0, 2295	0000	34	0, 1129	0, 2121
0, 2034	0, 0638	++	35	0, 1075	0, 0336
0, 2034	0, 0357	+	36	0, 1600	0, 0323
0, 1781	0, 1639	+	37	0, 1781	0, 1515
0, 1184	0, 0625	+	38	0, 1154	0, 0571
0, 0988	0, 0667	+	39	0, 0941	0, 0625
0, 1429	0, 0286	++	40	0, 1370	0, 0270
0, 1184	0, 0725	++++	41	0, 1154	0, 0667
0, 1410	0, 0314	++	42	0, 1341	0, 0290
0, 1800	0, 3137	+	43	0, 1667	0, 2963
0, 0900	0, 0794	+	44	0, 0822	0, 0725
0, 1700	0, 0980	0000	45	0, 1667	0, 0877
0, 1184	0, 0676	0000	46	0, 1125	0, 0602
0, 0714	0, 1754	++	47	0, 0667	0, 1515
0, 2031	0, 1129	++	48	0, 1940	0, 1029
0, 0870	0, 0833	0000	49	0, 0833	0, 0770
0, 0900	0, 0794	++	50	0, 0822	0, 0725

4.3 Korrelationen

Für die Berechnung der linearen Korrelation gilt die Formel: (14)

$$r = \frac{\sum x * y - 1 / n * \sum x * \sum y}{\sqrt{\left[\sum x^2 - 1 / n * \left(\sum x \right)^2 \right] * \left[\sum y^2 - 1 / n * \left(\sum y \right)^2 \right]}}$$

r = Korrelationskoeffizient

x = Meßwerte des einen Merkmals

y = Meßwerte des anderen Merkmals

n = Umfang der beiden Stichproben

Bei der Gegenüberstellung der drei Färbemethoden ergaben sich für den Vergleich der Zahl der Gesamtsumme der Granulozyten folgende Korrelationskoeffizienten:

Benzol - Heparin : r = 0,73

Pappenheim - Heparin : r = 0,80

Pappenheim - Benzol : r = 0,65

Vergleich der Lymphozyten:

Benzol - Heparin : r = 0,65

Pappenheim - Heparin : r = 0,88

Pappenheim - Benzol : r = 0,73

Vergleich der Monozyten:

Benzol - Heparin : $r = 0,23$

Pappenheim - Heparin : $r = 0,29$

Pappenheim - Benzol : $r = 0,05$

Vergleich der Summe aus Granulozyten und Monozyten:

Benzol - Heparin : $r = 0,85$

Pappenheim - Heparin : $r = 0,76$

Pappenheim - Benzol : $r = 0,51$

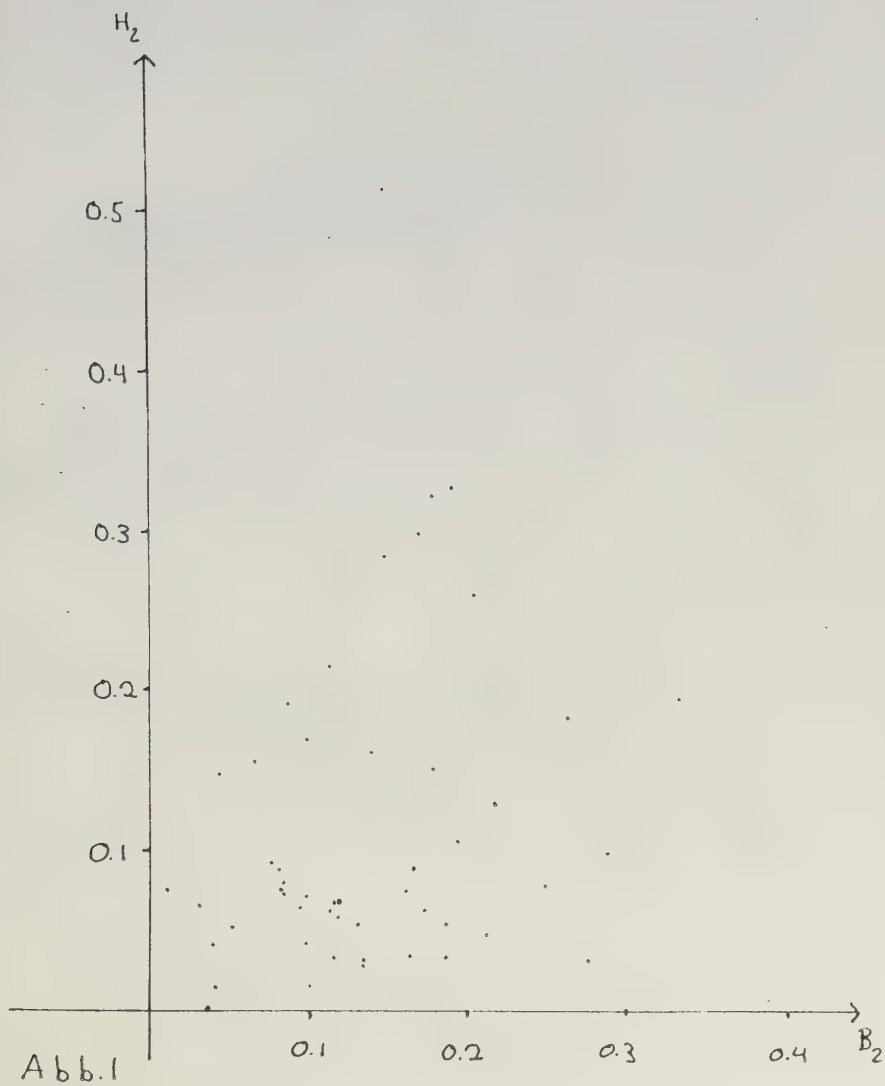
$A = 1\% : 0,4433$ $A = 1\% : 0,3541$ $A = 5\% : 0,2732$

$A =$ Irrtumswahrscheinlichkeit bei $n = 50$

Außer bei der Zahl der Monozyten sind alle drei Färbungen im Vergleich der Zelltypen signifikant korreliert.

Korreliert man die beiden oben angegebenen Quotienten H1 und B1, so erhält man als Koeffizienten $r = 0,23$. Für die Korrelation von B2 und H2 ist $r = 0,24$.

Die Korrelation von B1 und H2 ergibt einen Koeffizienten von $0,26$. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$ sind die beiden zu untersuchenden Färbemethoden in ihren Entzündungskriterien also nicht signifikant miteinander korreliert. Abbildung 1



Aus der Grundgesamtheit der Probanden wurden zwei Untergruppen gebildet; die erste Gruppe enthielt 20 Probanden ohne Entzündungszeichen nach Pappenheim. In der zweiten waren 30 Probanden mit mindestens einem Entzündungszeichen: + bis +++.

In der ersten Gruppe ergab sich ein Koeffizient von $r = 0,37$ ($n=20$) bei: $A = 1\% : 0,6524$
 $A = 1\% : 0,5368$
 $A = 5\% : 0,4227$

Es besteht keine signifikante Korrelation.

In der zweiten Gruppe ergab sich ein Koeffizient von $r = 0,19$ bei $A = 1\% : 0,5541$
 $A = 1\% : 0,4487$
 $A = 5\% : 0,3494$

Für $n = 30$ besteht ebenfalls keine signifikante Korrelation.

Die Gesamtsumme der nicht zu differenzierenden Zellen bei der Benzolfärbung ist 392, der Durchschnitt 7,84 ($n = 50$), bei der ersten Gruppe 6,60, bei der zweiten 8,70.

Der Vergleich von ngr und dgr bezogen auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten ergibt eine Korrelation von $r = 0,18$.

ngr		dgr
-----	bzw.	-----
ngr+gr+mo+ly		dgr+igr+mo+ly

Der Korrelationskoeffizient $r = 0,11$ ergibt sich für den direkten Vergleich der absoluten Zahlen der ngr und dgr aus Tabelle 1.

Vergleicht man die Zahl der dgr mit der Zahl der st in % ($r = -0,08$), so ergibt sich genauso, wie beim Vergleich der ngr mit den st ($r = -0,06$) keine signifikante Korrelation.

Die Korrelation zwischen der Zahl der Leukozyten und B2 beträgt $r = -0,16$, der Vergleich von H2 mit den Leukozyten ergibt $r = -0,03$.

Setzt man jedoch die bks ins Verhältnis zur Zahl der ngr, so ergibt sich immerhin bei einem Koeffizienten von $r = 0,29$ mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% eine positive Korrelation. Abbildung 2

Das Verhältnis bks zu dgr ist mit $r = -0,07$ nicht signifikant korreliert.

Die Regressionsgerade ist durch folgende Formel zu berechnen (14) :

$$m = \frac{n \cdot \sum x \cdot y - \sum y \cdot \sum x}{n \cdot \sum x^2 - \left(\sum x \right)^2}$$

$$b = \frac{\sum x^2 \cdot \sum y - \sum y \cdot x \cdot \sum x}{n \cdot \sum x^2 - \left(\sum x \right)^2}$$

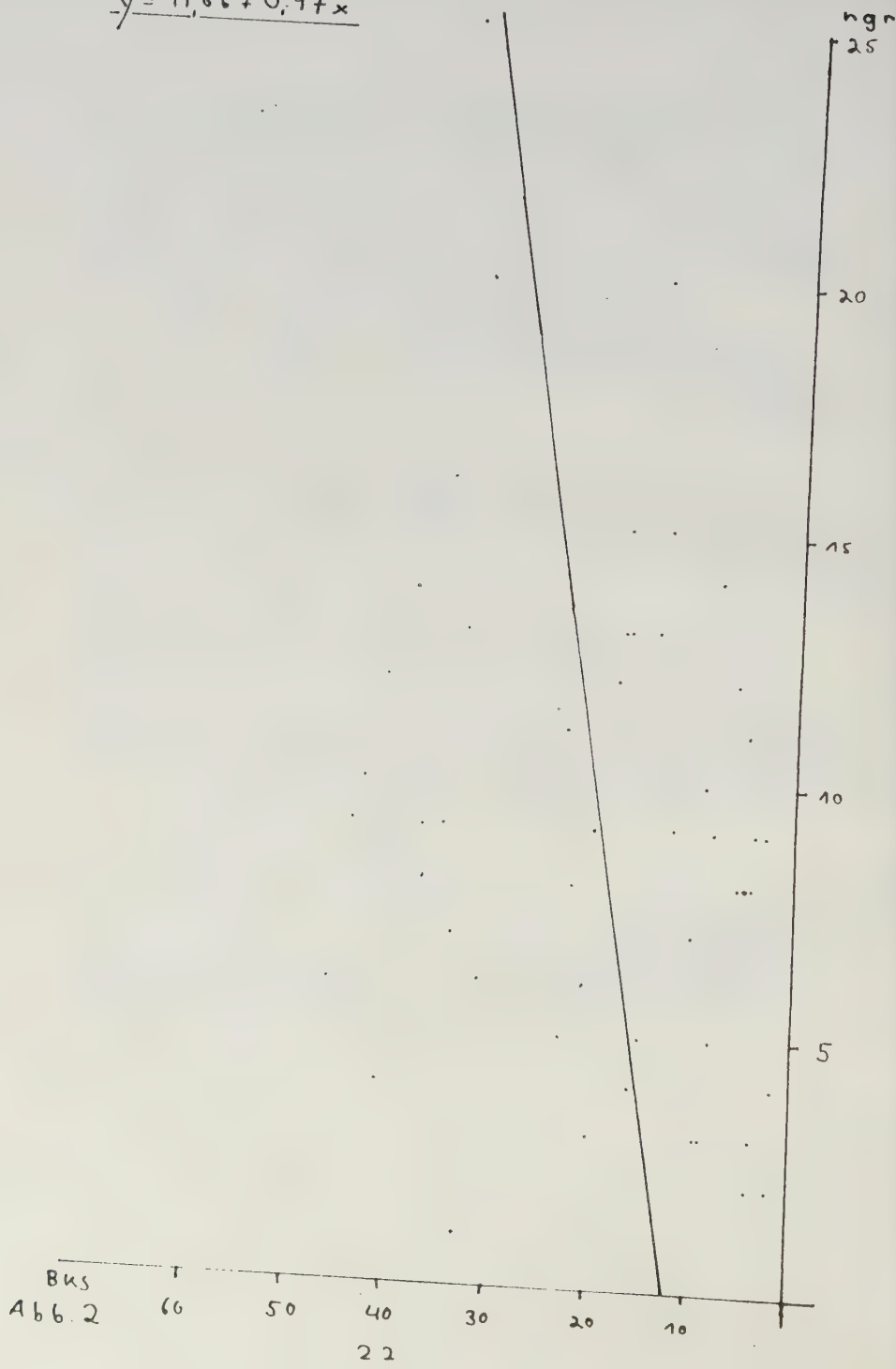
m = Steigung der Regressionsgeraden

b = Achsenabschnitt der R. - Geraden

x = Meßwerte der 1. Variablen

y = Meßwerte der 2. Variablen

$$\underline{y = 11,66 + 0,97x}$$



4.4 Vergleich

Die Gesamtzahl der Zahl der Degranulierten beträgt bei den 50 Patienten 467 Zellen. Der Durchschnittswert beträgt 9,34, die Standardabweichung 5,35, die Spannweite 1-25.

Bei den Devitalisierten ist die Gesamtsumme 339, der Durchschnittswert 6,8, die Standardabweichung 5,43 und die Spannweite 0-24.

Rechnet man die Zahl der ngr in Prozent und berücksichtigt man nicht die Zahl der nd, so ergibt sich beim Vergleich der Benzolfärbung mit der Heparinfärbung eine größere Anzahl der ngr im Verhältnis zu den dgr : $504 / 339$. In 34 der Fälle ist die Relation $\text{ngr} / \text{dgr} > 1$, in 13 Fällen $\text{ngr} / \text{dgr} < 1$ und in 3 Fällen $\text{ngr} / \text{dgr} = 1$.

Der Durchschnitt bei der Benzolfärbung beträgt bei den Untersuchungen 9,34 v. H. degranulierte Granulozyten bei im Durchschnitt immerhin 7,84 v. H. nicht zu differenzierenden Zellen im Verhältnis zu 6,78 v. H. devitalisierten Granulozyten in der Heparinfärbung. ($n = 50$)

In der Gruppe ohne Entzündungszeichen nach Pappenheim ($n = 20$) beträgt der Durchschnitt der ngr 9,00, der dgr 5,80 und der nd 6,60, in der Gruppe mit Entzündungszeichen nach Pappenheim ($n = 30$) liegt der Durchschnitt der ngr nur geringfügig mit 9,56 höher ebenso wie der Schnitt der dgr mit 7,43 und der nd mit 8,70.

5. Diskussion

Die Phagozyten, also Monozyten und Granulozyten, sind als immunkompetente Zellen des Blutes an der Immunabwehr, hauptsächlich durch ihre Befähigung zur Phagozytose und Pinozytose, beteiligt. Die Granulozyten entstehen über mehrere Zwischenstufen aus den Stammzellen im Knochenmark. Die Zellen sind amöboid beweglich, ihre Lebensfähigkeit beträgt 9-13 Tage, im Blut bleiben sie 7-9 Stunden, danach wandern sie ins periphere Gewebe aus. Die Granulozyten besitzen die Enzyme der Glykolyse und der indirekten Glukoseoxydation über den Pentose-Phosphatstoffwechsel. Wichtigstes Leitenzym ist die Peroxydase, außerdem findet man Flavoproteine, die H_2O_2 bilden. An hydrolytischen Enzymen sind Elastase, Kollagenase und eine alkalische Phosphatase bekannt. Die Phagozytose von Bakterien wird durch Chemotaxis eingeleitet; chemotaktisch wirksame Stoffe sind Komponenten des Komplementsystems, bakterielle Lipopolysaccharide, Abbauprodukte von Kollagen und andere Zellbruchstücke. Unter Mitwirkung von Opsoninen (Komplementfraktionen sowie gegen Bakterien gerichtete Antikörper) haften Bakterien oder andere Fremdkörper an der Zellmembran, diese stülpt sich ein und es wird ein Phagosom gebildet. Die Granula lagern sich an und ergießen ihren Inhalt in das Phagosom.

Phagozyten enthalten eine große Anzahl von Lysosomen, die mit einem hohen Potential von hydrolytischen und proteolytischen Enzymen ausgestattet sind. (8)

In den Phagosomen wird die Abtötung der Bakterien vorgenommen, hieran ist vor allem die Peroxidase beteiligt, die u.a. Jodid in Jod oxydiert, das freie Jod lagert sich an die Bakterienwand an und wirkt an der Zerstörung derselben mit. Ferner sind die Enzyme des Pentosephosphatzyklus und der Glutathion-Oxidation beteiligt.

In den Phagolysosomen werden oxydierende Agentien wie

Superoxidanionenradikale, Hydroxylradikale und Wasserstoffperoxyd in Kombination mit Myeloperoxidase produziert zum Abbau von phagozytiertem Material. Die Sauerstoffradikale werden zusammen mit den lysosomalen Enzymen extrazellulär wirksam. (11)

Schließlich besorgen lysosomale Hydrolasen den weiteren Abbau. Durch Regurgitation aus dem Lysophagosom können Enzyme auch in die Umgebung des Phagozyten geraten und damit eine Gewebsschädigung bewirken. Bei der Abtötung phagozytierter Mikroorganismen sind neben lysosomalen Enzymen Wasserstoffperoxid bzw. aktivierter Sauerstoff von Bedeutung.

Bei der Antigen-Antikörper-Reaktion kommt es zur Fixation von Komplement als Ursache von Immunadhärenz, Phagozytose und Zytolyse. Unter Immunadhärenz versteht man die Tatsache, daß mit Antikörper beladene Partikel in Gegenwart von Komplement klebrig werden und sich an Leukozyten, Thrombozyten oder Erythrozyten anhaften. Die Zytolyse geht nach Anlagerung der Antikörper an die Zellwand nur unter Komplementfixation vor sich. Dabei entstehen nach elektronenoptischen Untersuchungen Löcher an der Zellmembran, die einen Durchmesser von $10 \mu\text{m}$ besitzen. Unter Vermittlung von Ca^{2+} Ionen entsteht mit der Reaktion eines Fc-Stückes des Immunkörpers die Komplementaktivierung. C3a wirkt ähnlich wie C5a als Anaphylatoxin und besitzt Wirkung auf Chemotaxis und Gefäßpermeabilität. C5a bedingt Degranulierung von Neutrophilen, erhöhte Chemotaxis und Superoxid-Anion (O_2^-) Freisetzung, Permeabilitätserhöhung der Gefäße und Ödeme.

Unter Anlagerung des Bruchstückes C5b kommt es unter Vermittlung der Faktoren C6-C9 zur Zytolyse. (10 20)

Erkennt man in der Heparinfärbung eine große Anzahl devitalisierter Granulozyten, kann man davon ausgehen, daß eine Phagozytose stattgefunden hat und somit lysosomale Enzyme sowie aggressive Sauerstoffprodukte freigesetzt wurden. Eine durch aktivierte Komplementkomponenten bedingte Zellschädigung führt neben dem

Freiwerden hydrolytischer Enzyme auch zur Anhäufung von Prostaglandinen als Entzündungsmediatoren. (15 18 25)

Bei Aufnahme von Immunkomplexen an die FC Rezeptoren der Granulozyten kann es aber auch zur Exozytose lysosomaler Enzyme ohne Zerstörung der Zelle kommen.

Ein durch die Heparinfärbung dargestellter, devitalisierter Granulozyt ist zwar ein Hinweis einer Freisetzung lysosomaler Enzyme aber umgekehrt kann es zur Freisetzung solcher Enzyme auch ohne Zerstörung der Zellmembran kommen. (8 12 19)

Endotoxine und Exotoxine setzen mit anderen Faktoren (Antigen-Antikörper-Komplexe, Komplementfaktoren, aggregiertem IgG oder opsonierten Partikeln) aus Granulozyten Elastase, Kollagenase und andere lysosomale Enzyme frei. Die dadurch verursachte Degranulierung ist mit der Benzolfärbung nachweisbar. Es gibt aber nach Goldstein (6) verschiedene Arten der Degranulation, die nicht immer zu einer durch die Heparinfärbung sichtbaren Devitalisierung der Granulozyten führen.

Goldstein et alii unterscheiden zwischen:

1. Zelltod durch Auflösung der Zellmembran führt zur Freisetzung von Zytoplasma-Enzymen und Infiltration des Gewebes. Abbildung 3

2. Wiederausströmen während der Aufnahme (Regurgitating during feeding) :

Nach Aufnahme von unlöslichen Immunkomplexen oder anderen Partikeln wird ein Phagosom gebildet, das an seiner inneren Membran mit primären Lysosomen verbunden ist. Entweder aufgrund einer unvollständigen Verschmelzung der Vakuolen oder dem Weiterbestehen von

endozytischen Kanälen kommt es zum Wiederausströmen von lysosomalen Hydrolasen und damit zu entzündlichen Veränderungen des Gewebes ohne Untergang der Granulozyten. Möglicherweise führt dieser Mechanismus im rheumatischen Gelenk zu einer Freisetzung von verletzenden Substanzen aus polymorphen Leukozyten. Abbildung 4

3. Umgekehrte Endozytose oder Frustrane Phagozytose (frustrated phagocytosis) :

Diese häufig an Oberflächen (z.B. Gefäßendothel) stattfindende Form der Exozytose ist ein Prozeß, bei dem Material aus der Zelle heraustransportiert wird, das vorwiegend in Lysosomen gespeichert war. Bei Kontakt mit Immunkomplexen, die an festen Oberflächen (z.B. kollagene Membranen) haften, kleben sich die Granulozyten an und es kommt zur Bildung von Lysosomen.

Enzyme, die so ausgeschüttet werden, scheinen unter Umständen vorzukommen, die ähnlich einer Ausschüttung in eine Vakuole. Es kommt zu keiner Phagozytose und die Lebensfähigkeit der anliegenden Zelle ist nicht beeinträchtigt. Abbildung 5

4. Als letzte Möglichkeit wird die unmittelbare Enzymfreisetzung durch Einwirkung von C5a beschrieben. Abbildung 6 (6)

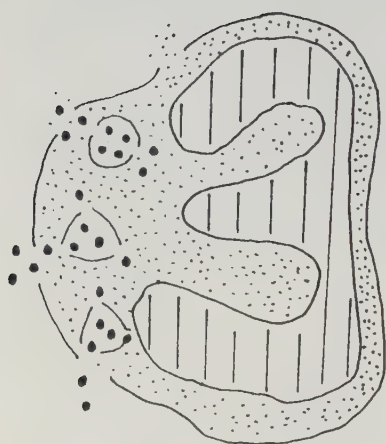


Abb. 3



Abb. 4

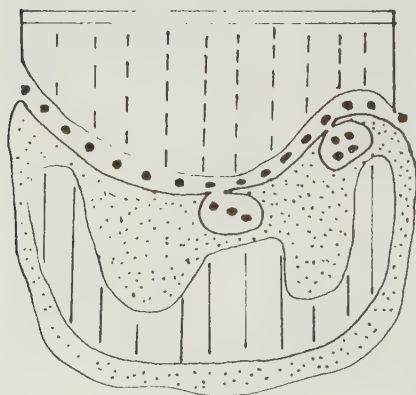


Abb. 5

$\Delta = C5a$

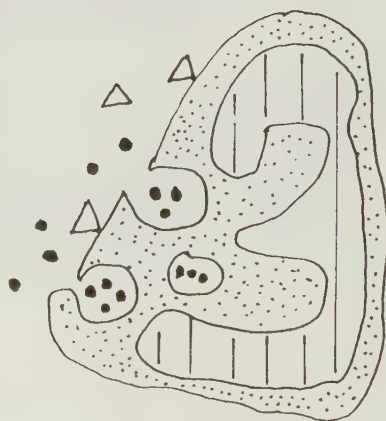


Abb. 6

Während bis vor kurzem die Wirkung nicht-steroidaler Antiphlogistika vor allem auf ihre Prostaglandin-synthetasehemmung zurückgeführt wurde, kamen in letzter Zeit auch andere Wirkungsmechanismen zur Diskussion. Eine der Voraussetzungen, daß eine Phagozytose von Immun-komplexen stattfindet, ist die verringerte CA-Konzentration auf der Innenseite der Phagozytenmembran, was durch einen komplizierten Pumpmechanismus bewirkt wird. (9)

Nichtsteroidale Antiphlogistika (untersucht wurden Indometacin, Ibuprofen und Piroxicam) könnten nun als CA-Blocker wirken und dadurch die zur Phagozytose notwendige Verringerung der CA-Konzentration an der Innenseite der Phagozyten verhindern. (3)

So ist also die Beurteilung des Entzündungsgeschehens aufgrund der Veränderung der Granulozyten bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen für den Verlauf der Therapie von großer Wichtigkeit.

Beide von Suschke et alii durchgeführten Färbemethoden zur Beurteilung der Granulozytenmorphologie zeigen Veränderungen an Granulozyten bzw. Phagozyten im Laufe von entzündlichen Erkrankungen, die eine Aussage über den Verlauf ermöglichen im Sinne einer wertvollen Ergänzung zu den bisher allgemein üblichen Laboruntersuchungen. Beide Methoden korrelieren nicht zum Anteil der stabkernigen in % sowie zur ausgezählten Leukozytenzahl in einem mm.

Die Schädigung der Granulozyten scheint wohl eigenen Gesetzen zu gehorchen und ist ein von den bisher bekannten Entzündungsparametern unabhängiges Geschehen.

Beim Vergleich mit der BKS, die bei Entzündungen, Tumoren, Dys- und Paraproteinämien u.a. erhöht ist, bedingt durch die Veränderung der Menge und Zusammensetzung der Plasmaproteine (besonders Fibrinogen und Globuline) bzw. Verschiebung des Albumin/Globulin-Quotienten, ergibt sich für die Benzolfärbung bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% immerhin eine signifikante Korrelation. (7 13 16)
Dieser Zusammenhang sollte jedoch bei einer größeren Probandenzahl genauer untersucht werden.

Wie Suschke et alii zeigen konnten, erlaubt die Heparinfärbung eine genaue Aussage über den Therapieerfolg bei der Behandlung rheumatischer Erkrankungen.
So muß z.B. bei einem Fortbestehen eines Anteils der devitalisierten über 20 % die Therapie neu überdacht werden. (23)

Es ist zwar denkbar, daß die Benzolfärbung aufgrund der im Vergleich zur Devitalisierung etwas häufiger vorkommenden Degranulation und aufgrund der besseren Korrelation zur BKS den Entzündungsvorgang genauer darstellt; nachteilig wirkt sich jedoch die relativ hohe Zahl der nicht zu differenzierenden Zellen (Spannweite 0-30, Durchschnitt 7,84/100) auf die Auswertung der Benzolfärbung aus

Außerdem ist die Verwendung von Benzol als Lipidlöser auf Dauer wegen seiner gesundheitsschädigenden Wirkung für das Laborpersonal problematisch.

6. Zusammenfassung

Es werden zwei Färbungen gegenübergestellt, die in der Klinik neben der herkömmlichen Pappenheimfärbung weitergehende Aussagen über den Beginn und den Verlauf entzündlicher Erkrankungen ermöglichen.

Bei der ersten Färbung (Benzolfärbung) wird nach Behandlung von EDTA-Blut mit Lipidlösungsmittel durch Herauslösung der Zellmembran in Verbindung mit einer Fluoreszenzfärbung ein Einblick in das Zellinnere und damit eine Beurteilung der Degranulierung der Granulozyten möglich.

Aufgrund eines unterschiedlich hohen Anteils nicht zu differenzierender Zellen, der die Genauigkeit dieser Methode in Frage stellt, wäre eine Verbesserung der Benzolfärbung wünschenswert.

Mit der zweiten Färbung (Heparinfärbung) kann man in Verbindung mit einer Fluoreszenz-Färbung vitale von devitalisierten Leukozyten trennen.

Unabhängig zu den allgemeingebräuchlichen Laborparametern BKS, CRP, Leukozytose und Linksverschiebung ist die Heparinfärbung ein weiterer Indikator der Entzündungsaktivität.

7.1 Literatur

- 1 Dingle, J. T. 1977
Lysosomes, A Laboratory Handbook
North-Holland Publ. Comp., Amsterdam New York Oxford
- 2 Drewes, A. E. 1984
Fluoreszenzmikroskopische Differenzierung der
Granulozyten im Blut Neugeborener
Diss. LMU München
- 3 Dunham P., C. Andersen, AM. Rich, G. Weissmann 1983
Stimulus response coupling in sponge cell
aggregation: Evidence for calcium as an
intracellular messenger.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80: 4756-4760.
- 4 Duswald K. H., M. Jochum, H. Fritz 1982
Neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie und Patho-
biochemie der Sepsis und des septischen Schocks
Intens Care
- 5 Duswald, K. H. 1983
Zur Pathobiologie der Leukozyten-Elastase
G-I-T Verlag Ernst Giebler, Darmstadt
- 6 Goldstein, M. 1976
Polymorphonuclear Leukozyte Lysosomes
and Immune Tissue Injury
Prog. Allergy Vol. 20
S. 301-328
- 7 Gross R. 1982
Lehrbuch der Inneren Medizin
F. K. Schattauer Verlag 6. Auflage: S. 205
- 8 Henson PM. 1971
Interactions of cells with immune
complexes: Adherence, release of

constituent and tissue injury
J. exp. Med. 134: 145-151

- 9 Horn W., 1984
Neuere Theorien der Phagozytose und methodische
Probleme bei der Untersuchung von Phagozytendefekten
bei Diabetikern.
Immun-Infekt 12, S. 13-19
- 10 Karlson P., W. Grob, W. Gross 1978
Pathobiochemie
Thieme Verlag
S. 323-324
- 11 Klebanoff SJ., Ra. Clark 1978
The neutrophil Function and clinical Disorders
North Holland Publ. Comp. Amsterdam New York Oxford
- 12 Ohlson K., I. Ollson 1977
The extracellular release of granulozyte collagenase
and elastase during phagozytosis and inflammatory
process.
Scand. J. Hämatol. 19: 145-151
- 13 Pschyrembel 1982
Klinisches Wörterbuch S. 150
Walther de Gruyter 254. Auflage
- 14 Ramm B., G. Hofmann 1982
Biomathematik
Enke Verlag, 2. Auflage
S. 75-79
- 15 Rutherford B., H. A. Schenkein 1983
C3 Cleavage Products Stimulate Release of
Prostaglandines by Human
Mononuclear Phagozytes in Vitro
I. Immunol. 130: 874-877
- 16 Schmidt R.F., G. Thews, Ch. Weiss 1977
Physiologie des Menschen
Springer Verlag, 19. Auflage; S. 329

- 17 Schöberl, H. 1982
Färbeverhalten mit Pseudoisocyanchlorid von
Leukozyten bei Normalpersonen und Patienten
mit leukämischen Erkrankungen
Diss. LMU München

- 18 Schorlemmer H.G., Ph. Davies, Ac. Allison 1975
Ability of activated complement release from
macrophages
Nature 261: 48-49

- 19 Sedlack HH., FR. Seiler 1983
Prophylaxe und Therapie mit Immunglobulinen:
Eine kritische Stellungnahme zur Frage der
Immunkomplex-bedingten Entzündungsreaktion
Beitr. Infusionstherapie klin. Ernährung
Vol. 11, pp 6-19
Karger Basel

- 20 Siegenthaler W., H. Warnatz 1979
Klinische Pathophysiologie
Thieme Verlag, 4. Auflage
S. 506-514

- 21 Smolen J.E., G. Weissmann 1978
Neutral proteases of human polymorphnuclear
leukocytes
Urban u. Schwarzenberg Verlag, Baltimore,
München, S. 56

- 22 Stacheter, M. 1983
Das Differentialzellbild der Synovialflüssigkeit
Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung
Diss. LMU München

- 23 Suschke H. J.
Beurteilung der Vitalfärbung von Leukozyten bei
Kindern mit entzündlich rheumatischen Erkrankungen
Noch nicht veröffentlicht

- 24 Suschke H. J., W. Miehle, Th. Noss, S. Stotz 1984

Granulozytenmorphologie bei entzündlichen
Erkrankungen
Aktuelle Rheumatologie, Band 9 Thieme Verlag

- 25 Webster RO., ST. R. Hong, R. B. Johnston,
P. M. Henston 1980
Biological Effect of the Human Complement
Fragments C5a on Neutrophil Function

LEBENS LAUF

Name: Walter Wilhelm Eduard Koch

Geburtsdatum: 22. 12. 1958 in Aachen

Eltern: Eduard Koch, Regierungsbaudirektor
Agnes-Therese Koch, geb. Nacken

Schulabschluß: 1977 Abitur am städtischen
Dreikönigsgymnasium in Köln

Studium: SS 1978 bis WS 1984/1985 an der
Universität zu Köln

Physikum: August 1980

1. Staatsexamen: März 1982

2. Staatsexamen: August 1983

3. Staatsexamen:

schriftlicher Teil: Oktober 1984

mündlicher Teil : November 1984

Approbation erteilt am 3. 12. 1984

Beruf: 1. 1. 1985 - 30. 4. 1986 Kinderpoliklinik
der LMU München

